



PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA DE SEMENTES DE SOJA E MILHO POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE RAIOS X

F.G. Gomes-Junior¹, C.M.P. Vaz², S.M. Cicero¹, L.A.C. Jorge²

(1) Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP, Avenida Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba, SP, francisco1@usp.br, smcicer@usp.br

(2) Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, carlos.vaz@embrapa.br, lucio.jorge@embrapa.br

Resumo: A microtomografia computadorizada de raios X (micro-TC) é uma técnica não destrutiva que possibilita a obtenção de imagens 3D de pequenos objetos e com alta resolução. O objetivo dessa pesquisa foi otimizar os parâmetros de micro-TC para aquisição e reconstrução de imagens de sementes de soja e de milho, possibilitando a visualização adequada da morfologia interna. As sementes foram escaneadas utilizando o microtomógrafo de bancada SkyScan 1172 cujo tamanho do pixel detector é de 0,8 μm . Imagens com melhor resolução e contraste foram obtidas usando passo de rotação de 0,2°, rotação total de 180° e média de cinco quadros (*frames*) para cada passo de rotação. Além de proporcionar redução de aproximadamente uma hora no tempo de aquisição em relação à utilização do filtro de alumínio, as imagens geradas sem filtro promoveram a visualização mais nítida das estruturas internas das sementes, como a identificação do cilindro central e dos pontos de acúmulo de lipídio na semente de soja e a diferenciação estrutural do endosperma, cotilédone e eixo embrionário na semente de milho. Assim, conclui-se que para a visualização adequada da morfologia interna de sementes de soja e de milho, utilizando o microtomógrafo SkyScan 1172, não se deve utilizar filtro metálico durante a aquisição das projeções e na reconstrução das imagens devem ser aplicados procedimentos para a correção de artefatos de anel, endurecimento de feixe (*beam hardening*) e filtro para redução do ruído na imagem.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Zea mays*, análise de imagens, tomografia de raios X, qualidade de sementes.

PROCEDURES FOR STRUCTURE EVALUATION OF SOYBEAN AND CORN SEEDS BY X-RAY MICRO-COMPUTED TOMOGRAPHY

Abstract: X-ray micro-computed tomography (micro-CT) is a non-invasive imaging technique that can produce detailed 3D images of small objects in very high resolution. The objective of this research was optimize the acquisition and reconstruction micro-CT parameters of soybean and corn images for appropriate visualization of the seed internal morphology. Seeds were scanned using the SkyScan 1172 benchtop micro-CT scanner with a detector pixel size of 0.8 μm . Optimal images were obtained using rotation steep of 0.2°, total rotation of 180° and five averaging frames for each section during acquisition. In addition to providing a reduction in about one hour in the acquisition time, when compared to the use of aluminum filter, the images obtained without filter promoted a sharper visualization of the seed internal structures, as the central cylinder and lipid accumulation spots in soybean seed and structural differences among the endosperm, cotyledon and embryo axis in corn seed. For the appropriate examination of internal morphological parameters of soybean and corn seeds using the SkyScan 1172 micro-CT metal filter should not be used for image acquisition and reconstruction should include ring and beam hardening artifact correction and smooth filtering as well.

Keywords: *Glycine max*, *Zea mays*, image analysis, X-ray tomography, seed quality.

1. Introdução

A microtomografia de raios X (micro-TC) é uma técnica que permite a obtenção de imagens com alta resolução de seções transversais de um objeto e de forma não destrutiva, nas quais são mapeados parâmetros físicos como a densidade e a porosidade de cada região interna. Essas seções são apresentadas na forma de imagens bidimensionais que podem ser compostas e obter objetos virtuais em escala tridimensional (LASSO et al., 2008). A utilização da micro-TC nas ciências agrárias iniciou-se na década de 90 com o uso de equipamentos customizados (MACEDO, 1997; MACEDO et al., 2002), mas a partir de 2000 teve grande impulso devido ao aparecimento de equipamentos comerciais com custo acessível (VAZ et al., 2011; BELINI et al., 2011).

A aplicação da micro-TC para avaliação da morfologia interna de sementes ainda é bastante restrita, sendo encontrados na literatura poucos trabalhos utilizando essa técnica. O primeiro passo para a avaliação de novos materiais utilizando os microtomógrafos de raios X consiste na definição dos parâmetros de aquisição e reconstrução.

ção que promovam a obtenção de imagens nítidas e com o mínimo possível de artefatos. No caso das sementes de soja e milho, esses parâmetros ainda não foram estabelecidos e, portanto, para que essa técnica possa ser explorada em estudos visando à identificação de problemas associados à morfologia interna dessas sementes, a prioridade é definir as condições mais apropriadas para a obtenção de imagens de alta qualidade.

O objetivo dessa pesquisa foi otimizar os parâmetros de aquisição e reconstrução de imagens de sementes de soja e milho utilizando o microtomógrafo de raios X SkyScan 1172, para visualização adequada da morfologia interna de sementes.

2. Materiais e Métodos

Sementes de soja (cultivar CD 224) e de milho (híbrido 2B604PW) foram submetidas à análise no microtomógrafo de raios X SkyScan 1172 do Laboratório de Técnicas Nucleares da Embrapa Instrumentação Agropecuária, em São Carlos, SP.

Para a aquisição das imagens dos cortes tomográficos foi utilizado um suporte específico de latão e o adequado posicionamento das sementes foi definido fixando a semente de soja no suporte e mantendo a região oposta ao hilo voltada para baixo e a de milho mantendo-se a região do embrião voltada para cima. Foi utilizada fita dupla-face 3M VHB para posicionar a semente no suporte e recobrimento com parafilme para sua fixação (Figura 1).

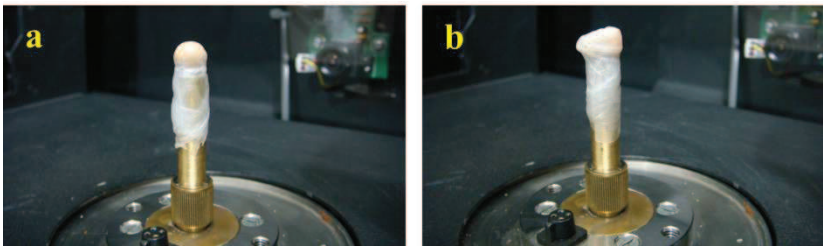


Figura 1. Sementes de soja (A) e milho (B) posicionadas no interior do microtomógrafo, fixadas no suporte de latão com auxílio de fita dupla-face e recobertas com parafilme.

Na definição dos parâmetros de aquisição das seções transversais de sementes de soja e de milho foram analisadas as resoluções de câmera de 2000 x 1048 pixels (modo 2K) e 4000 x 2300 pixels (modo 4K), com e sem a utilização de filtro de alumínio. Também, foram avaliados diferentes passos de rotação angular em rotação total de 180° ou 360° e número de quadros (*frames*) para obtenção da média em cada passo de rotação.

Na reconstrução das imagens foi utilizado o software NRecon e foram avaliadas diferentes variações no percentual de correção do artefato de *beam hardening* (0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100%), além dos parâmetros de correção de artefato de anel e filtro para redução do ruído, com valores variando de 0 a 20 e de 0 a 10, respectivamente. Em função do tamanho médio das sementes de soja e de milho e para a visualização total das sementes foi estabelecida uma resolução espacial típica de aproximadamente 6,5 µm.

3. Resultados e Discussão

Os tempos para aquisição das seções tomográficas da semente de soja sem o uso do filtro de Al foram de aproximadamente 71 min. no modo 2K (Tabela 1) e 140 min. no modo 4K (dados não apresentados). Com isso optou-se pelo modo 2K devido ao menor tempo de aquisição das imagens e a visualização adequada das estruturas internas das sementes de soja e de milho. Outros parâmetros de aquisição estabelecidos foram rotação total de 180°, passo angular de 0,2° e cinco quadros (*frames*) para obtenção da média em cada passo de rotação.

Tabela 1. Parâmetros definidos para aquisição e reconstrução dos cortes tomográficos das imagens de sementes de soja e milho utilizando o microtomógrafo de raios X SkyScan 1172.

Parâmetro	Soja		Milho
	sem filtro	filtro Al	sem filtro
<i>Aquisição (modo 2K)</i>			
Tamanho do pixel (µm)	6,3	6,5	6,6
Rotação total	180°	180°	180°
Passo de rotação	0,2°	0,2°	0,2°
Número de quadros (<i>frames</i>)	5	5	5
Tempo de aquisição (min.)	71	144	75
<i>Reconstrução (software NRecon)</i>			
Correção de <i>beam hardening</i> (%)	70	20	60
Correção de artefato de anel (<i>ring</i>)	20	20	20
Filtragem do ruído (<i>smoothing</i>)	2	2	2

As imagens adquiridas sem o uso do filtro de Al apresentaram o artefato de imagem conhecido como *beam hardening* (endurecimento de feixe), que pode ser evidenciado nos histogramas de porcentagem de voxels em função de tons de cinza (Figuras 2a e 2c). Esse efeito é associado à presença de fótons de baixa energia gerados no tubo de raios X, também observado por Vaz et al. (2011) em amostras de solo quando não foi utilizado filtro metálico durante a aquisição das imagens. Entretanto, quando foi utilizado filtro de Al esses artefatos foram reduzidos drasticamente devido ao corte da quase totalidade dos fótons de baixa energia (Figura 2b).

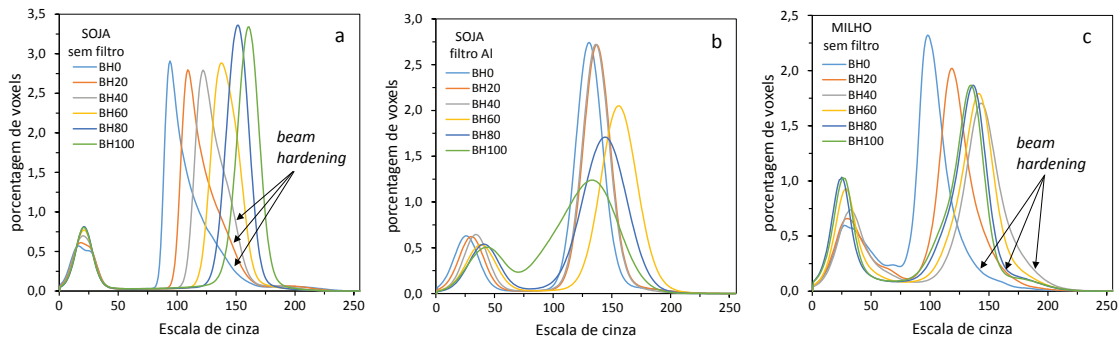


Figura 2. Histogramas de porcentagem de voxels nas diferentes configurações de *beam hardening* (BH) durante a reconstrução das seções tomográficas de sementes de soja na ausência (a) e presença (b) de filtro de Al e de milho na ausência de filtro de Al (c).

Com a correção de *beam hardening* de 70% e 60% nas imagens da semente de soja e de milho adquiridas sem utilização de filtro de Al obteve-se a condição ótima para reconstrução das imagens. Além de reduzir em aproximadamente 1 h o tempo de aquisição (Tabela 1), essas configurações proporcionaram uma visualização mais nítida das estruturas internas da semente de soja (eixo do embrião e pontos de acúmulo de óleo) em comparação com as imagens adquiridas com utilização de filtro de alumínio (Figura 3). Na semente de milho foi possível identificar com detalhes a ocorrência de injúrias mecânicas internas e as estruturas anatômicas, como os grânulos de amido do cotilédono e o eixo do embrião (Figuras 3g e 3h).

Para a reconstrução das seções tomográficas das sementes de soja e milho as condições ideais foram obtidas utilizando-se o máximo de correção de artefato de anel (20) e filtros para redução de ruídos de 2, dentro de uma escala variando de 0 a 10 (Tabela 1). O tempo médio para reconstrução das seções tomográficas para visualização em 3D foi de aproximadamente 1 h para cada semente, utilizando três computadores (*host + cluster*).

Os resultados obtidos nessa pesquisa representam um avanço significativo do conhecimento sobre análise de imagens em Tecnologia de Sementes, evidenciando o potencial de utilização da micro-TC para a avaliação da morfologia interna de sementes de soja e de milho em escala tridimensional e com alto grau de definição. Ainda, os parâmetros de aquisição e reconstrução poderão auxiliar na adequação da análise para sementes de outras espécies e em diferentes finalidades, como a avaliação da ocorrência de injúrias mecânicas, de injúrias causadas por insetos, de anormalidades embrionárias ou de outras alterações morfológicas provocadas por agentes bióticos e abióticos.

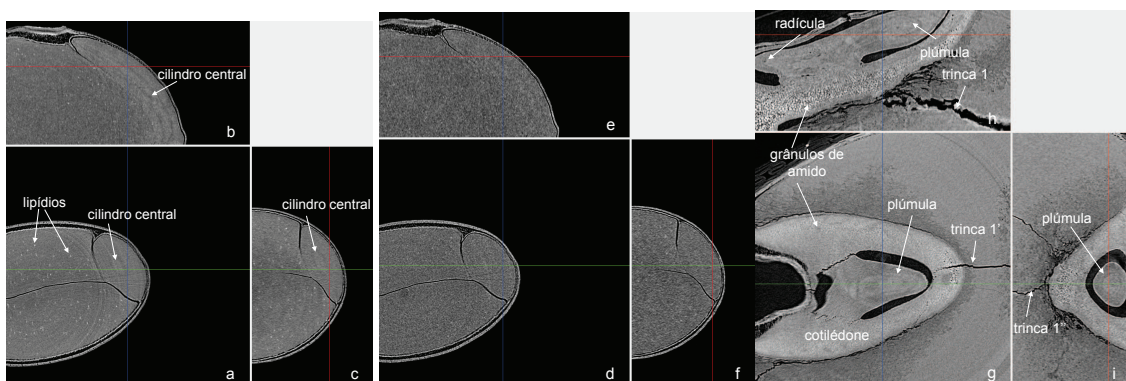


Figura 3. Seções tomográficas de uma semente de soja nas direções axial (a, d), coronal (b, e) e sagital (c, f), adquiridas com e sem filtro de Al e reconstruídos com correção de BH = 70% (sem filtro) e 20% (com filtro Al), correção de artefato de anel = 20 e filtragem de ruído = 2. Semente de milho: imagem detalhada das seções do eixo embrionário nas direções axial (g), coronal (h) e sagital (i), adquiridas sem filtro de Al, com correção de BH = 60%, artefato de anel = 20 e filtragem de ruído = 2.

4. Conclusões

Para a visualização adequada da morfologia interna de sementes de soja e de milho utilizando o microtomógrafo SkyScan 1172 não deve ser utilizado filtro metálico durante a aquisição das seções e na reconstrução das imagens devem ser aplicados correção de artefato de anel = 20, filtros para redução de ruídos (*smoothing*) = 2 e correção de *beam hardening* de 70% e 60% para as sementes de soja e milho, respectivamente.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa (proc. 2012/24678-7) e ao CNPq (proc. 304951/2013-7). Aos analistas Luiz F. Matteo e Paulo R.O. Lasso pelo auxílio nas análises microtomográficas das sementes.

Referências

- BELINI, U. L.; TOMAZELLO FILHO, M.; CASTRO, V. R.; MUNIZ, G. I. B.; LASSO, P. R. O.; VAZ, C. M. P. Microtomografia de raios X (microCT) aplicada na caracterização anatômica da madeira de folhosa e de conífera. *Floresta e Ambiente*, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2011.
- LASSO, P. R. O.; VAZ, C. M. P.; NAIME, J. M. Recomendações para utilização do microtomógrafo de raios X Sky Scan 1172 em ciências agrárias e biológicas. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. 22 p (Documentos, 37).
- MACEDO, A. S. Construção e uso de um tomógrafo com resolução micrométrica para aplicações em ciência do solo e meio ambiente. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Paulo (CRHEA), Universidade de São Paulo, São Carlos, 129p. 1997.
- MACEDO, A.; VAZ, C.M.P.; PEREIRA, J. C. D.; NAIME, J. M.; CRUVINEL, P. E.; CRESTANA, S. Wood density determination by X- and gamma-ray tomography. *Holzforschung*, v. 56, n. 5, p. 535-540, 2002.
- VAZ, C. M. P.; MARIA, I. C.; LASSO, P. O.; TULLER, M. Evaluation of an advanced benchtop micro-computed tomography system for quantifying porosities and pore-size distributions of two brazilian oxisols. *Journal of Soil Science Society of America*, v. 75, n. 3, p. 832-841, 2011.